ผลงานที่ใช้ในการประเมินเรื่อง

“ศึกษาจำนวนครั้งในการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel สำหรับการเตรียม Fluid specimen โดยวิธี Cyto-spin”

(A study of repeatedly used Chamber megafunnel for Fluid specimen by Cyto-spin preparation)

โดย

นางสาวศวิภา ขามาลา
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการด้านบริการทางวิชาการ
ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์
ตำแหน่งเลขที่ ๓๙๔๔

กลุ่มงานเซลล์วิทยา ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์
สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์

บทคัดย่อ

การเตรียมสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย (Fluid specimen) ที่มีลักษณะใสและปริมาณน้อย เช่น น้ำจากไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid) น้ำจากปัสสาวะ (Urine) หรือน้ำจากเยื่อหุ้ม-ปอด (Pleural effusion) น้ำจากช่องท้อง (Peritoneal effusion) ที่มีปริมาณมากแต่ลักษณะใส จำเป็นต้องใช้วิธี Cyto-spin เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา วิธีนี้เป็นการปั่นเหวี่ยงเซลล์ให้ตกตะกอนลงบนสไลด์อัตโนมัติทำให้ได้เซลล์ปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นและเพียงพอต่อการวินิจฉัย อุปกรณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งของวิธีนี้คือ Chamber megafunnel ใช้สำหรับบรรจุ Fluid specimen ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาจำนวนครั้งในการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel ที่ยังสามารถใช้ได้และมีปริมาณเซลล์ที่เพียงพอและยอมรับได้ในการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาเช่นเดียวกับ Chamber megafunnel ที่เปิดใช้ครั้งแรก โดยนำ Chamber megafunnel จำนวน 3 ชิ้น มาทำการเตรียมด้วยวิธี Cyto-spin แล้วนำสไลด์ที่ได้มาย้อมสีด้วยวิธี Papanicolaou จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยดูปริมาณเซลล์ การเรียงตัวอยู่ในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์

จากการทดลอง Chamber megafunnel ทั้ง 3 ชิ้น พบว่า Chamber megafunnel A ใช้ได้ 40 ครั้ง Chamber megafunnel B ใช้ได้ 36 ครั้ง และ Chamber megafunnel C ใช้ได้ 38 ครั้ง โดยเฉลี่ยแล้วสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 38 ครั้ง ปริมาณเซลล์ การเรียงตัวอยู่ในกรอบและการ Well - preserved ของเซลล์ จะเทียบเท่ากับการเปิดใช้ Chamber megafunnel ในครั้งแรก แต่หากมีการใช้ซ้ำมากกว่านี้ก็จะยังสามารถใช้ต่อไปได้ แต่ปริมาณเซลล์และการเรียงตัวอยู่ในกรอบจะลดลง เริ่มมีการกระจายหลุดออกนอกกรอบมากขึ้นทำให้ปริมาณเซลล์ที่ได้ในพื้นที่ Cyto-spin ลดน้อยลงด้วยเช่นกัน แต่ไม่มีผลกับการ Well - preserved ของเซลล์

ดังนั้น กลุ่มงานเซลล์วิทยา จึงใช้ Chamber megafunnel 1 ชิ้น จำนวน 38 ครั้ง ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับการเตรียม Fluid specimen ได้ เนื่องจากการเตรียม Fluid specimen 1 รายจะใช้ Chamber megafunnel 2 ชิ้น เมื่อนำมาเตรียมทั้งหมด 38 รายจะคิดเป็นเงิน 13,680 บาท จากการทดลองนี้ใช้เพียง 360 บาท จึงสามารถลดต้นทุนในการเตรียมสิ่งส่งตรวจได้ 13,320 บาท

คำนำ

สถาบันพยาธิวิทยา กลุ่มงานเซลล์วิทยาได้รับสิ่งส่งตรวจจากอวัยวะสืบพันธุ์สตรี (Gynecology) และอวัยวะอื่นๆ (Non-gynecology) เพื่อวินิจฉัยโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ จากโรงพยาบาลทั่วประเทศ ดังนั้นสิ่งส่งตรวจที่กลุ่มงานเซลล์วิทยาได้รับจึงมีหลากหลายรูปแบบ เช่น สไลด์ หรือเป็นน้ำ (Fluid specimen) เป็นต้น

สิ่งส่งตรวจที่เป็น Fluid specimen นี้ ต้องนำมาเตรียมให้อยู่ในรูปแบบของสไลด์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงจำเป็นต้องเตรียมโดยวิธี Cyto-spin ซึ่งเป็นวิธีการปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์โดยอัตโนมัติ อุปกรณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับวิธีนี้คือ Chamber megafunnel ซึ่งมีไว้สำหรับใส่ Fluid specimen และสไลด์ อุปกรณ์นี้มีราคาค่อนข้างสูง ผลิตมาเพื่อใช้ 1 ชิ้นต่อ 1 ครั้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาจำนวนครั้งในการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel เพื่อลดค่าใช้จ่ายต้นทุนการเตรียมสิ่งส่งตรวจของสถาบันพยาธิวิทยา

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วย ผู้ปฏิบัติงานด้านเซลล์วิทยาและผู้สนใจทุกท่าน หากมีข้อเสนอแนะต่างๆ ข้าพเจ้ายินดีน้อมรับด้วยความขอบพระคุณยิ่ง เพื่อพัฒนาให้เกิดประโยชน์กว้างขวางในโอกาสต่อไป

สารบัญ

เรื่อง		**หน้า**
บทคัดย่อ		ก
บทที่1	บทนำ.....	1
บทที่2	ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	2
บทที่3	ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	8
บทที่4	ผลการดำเนินงาน.....	10
บทที่5	บทสรุปและวิจารณ์.....	13
บรรณานุกรม.....		14

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ การเรียงตัวอยู่ในกรอบ
และการ Well - preserved ของเซลล์ ของ Chamber megafunnel
ทั้ง 3 ชิ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 10

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)..... 5

รูปที่ 2 แสดงเครื่องปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์อัตโนมัติ (Cyto-spin)..... 6

รูปที่ 3 แสดงอุปกรณ์ประกอบ (Chamber megafunnel)..... 7

รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (Cellularity) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 8

รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบการเรียงตัวอยู่ในกรอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 9

รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบการ Well - preserved ของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 9

รูปที่ 7 แสดงลักษณะ ปริมาณเซลล์ (Cellularity) และการเรียงตัวอยู่ในกรอบในพื้นที่ Cyto-spin..... 11

รูปที่ 8 แสดงลักษณะ การ Well - preserved ของเซลล์..... 11

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 แสดงปริมาณเซลล์ การเรียงตัวในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์ 10

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเตรียมสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยาที่เป็นน้ำเจาะจากส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Fluid specimen) ที่มีลักษณะใสและปริมาณน้อย ได้แก่ น้ำจากไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid) น้ำปัสสาวะ (Urine) หรือน้ำจากส่วนต่างๆ ของร่างกายที่มีปริมาณมากแต่มีลักษณะใส เช่น น้ำจากช่องปอด (Pleural effusion) น้ำจากช่องท้อง (Peritoneal effusion) เป็นต้น สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำเหล่านี้จะต้องนำมาเตรียมให้อยู่ในรูปแบบของสไลด์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงจำเป็นต้องเตรียมโดยวิธี Cyto-spin ซึ่งเป็นวิธีการปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์โดยอัตโนมัติ อุปกรณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับวิธีนี้คือ Chamber megafunnel ซึ่งมีไว้สำหรับใส่ Fluid specimen และสไลด์ อุปกรณ์นี้มีราคาค่อนข้างสูง ผลิตมาเพื่อใช้ 1 ชิ้นต่อ 1 ครั้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาจำนวนครั้งในการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel เพื่อลดค่าใช้จ่ายต้นทุนการเตรียมสิ่งส่งตรวจของสถาบันพยาธิวิทยา

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาจำนวนครั้งในการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel
2. เพื่อลดค่าใช้จ่ายต้นทุนการเตรียมสิ่งส่งตรวจ

วิธีดำเนินการ

1. นำ Fluid specimen มาเตรียมโดยวิธี Cyto-spin โดยใช้ Chamber megafunnel ซ้ำจำนวน 50 ครั้ง ทั้งหมด 3 Chamber megafunnel (A, B, C)
2. ดูสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการปริมาณเซลล์ การเรียงตัวอยู่ในกรอบและการ Well - preserved ของเซลล์ โดยให้เกณฑ์ผ่าน/ ไม่ผ่าน เทียบกับการเปิดใช้ Chamber megafunnel ในครั้งแรก
3. รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการดำเนินงาน

ระยะเวลาดำเนินการ

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2562

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

การเตรียมสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การเตรียมสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยามีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสิ่งส่งตรวจ

1. สิ่งส่งตรวจทาง Exfoliative cytology

1.1 Body fluid ที่มีปริมาณโปรตีนสูง เช่น Pleural effusion, Ascitic fluid, Pericardial effusion, Pus จากแหล่งต่างๆ ให้ปฏิบัติดังต่อไปนี้

- ควรส่งสิ่งส่งตรวจปริมาตรตั้งแต่ 50 – 200 ml ขึ้นไป
- ส่งสิ่งส่งตรวจพร้อมใบขอส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา โดยไม่ต้องเติมน้ำยา Fixative ใดๆ ทั้งสิ้น
- ในกรณีที่ติดวันหยุดราชการ หรือสุดสัปดาห์สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-6°C (ห้ามแช่ในช่องแข็ง) แล้วส่งห้องปฏิบัติการในวันทำการได้
- ในกรณีที่ไม่มีห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาในหน่วยงานและต้องการส่งไปตรวจยังห้องปฏิบัติการอื่น ควรทำเป็นสไลด์โดยไม่ต้องย้อมสี

1.2 Body fluid ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ เช่น Cerebrospinal fluid, Voided urine, Cystoscopic urine เป็นต้น หรือ ของเหลวที่ได้จากหัตถการ Washing จากอวัยวะต่างๆ ยกเว้น จากระบบทางเดินหายใจ เช่น Bladder washing, Peritoneal washing เป็นต้น

- สิ่งส่งตรวจเหล่านี้ต้องนำมาส่งห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาภายในเวลา 30 นาที หลังจากที่ทำหัตถการเสร็จ เนื่องจากเซลล์เสื่อมสภาพได้เร็ว
- ในกรณีที่ไม่มีห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาในหน่วยงานและต้องการส่งไปตรวจยังห้องปฏิบัติการอื่น ควรทำเป็นสไลด์ไม่ต้องย้อมสี

1.3 สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เช่น Bronchoalveolar lavage (BAL), Bronchial washing, Sputum ที่อยู่ในสภาพของเหลวหรือกึ่งของเหลว รวมถึง Bronchial brushing ขึ้นกับว่าตัวอย่างเซลล์ถูกป้ายมาบนสไลด์ หรือเก็บไว้ใน Fixative

1.4 สิ่งส่งตรวจจาก Direct lung tap เตรียมสไลด์เช่นเดียวการทำ Fine needle aspiration (FNA) สิ่งส่งตรวจที่เป็นสารน้ำ หากไม่สามารถส่งตรวจภายใน 24 ชั่วโมงให้แช่ในตู้เย็น (ช่องธรรมดา)

1) สิ่งส่งตรวจจากหัตถการ Fine needle aspiration (FNA) เจาะจากก้อนต่างๆ บนร่างกาย เช่น ต่อมน้ำเหลือง (Lymph node) ไทรอยด์ (Thyroid) ต่อมน้ำลาย (Salivary gland) เต้านม (Breast) เป็นต้น

2) Cervicovaginal smear (Pap smear) เก็บตัวอย่างเซลล์จากบริเวณปากมดลูกของสตรีเพื่อตรวจหามะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มแรก

สิ่งส่งตรวจที่เป็นสไลด์ซึ่งผ่านการ Fixative ด้วย 95% alcohol มาแล้วสามารถนำมาย้อมสีได้ทันที ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลวชนิดที่ไม่มีความหนืดมาก เช่น Pleural effusion, Peritoneal effusion นำมาเตรียมให้เป็นสไลด์จำนวน 4 แผ่น โดยใช้เครื่อง Cyto-spin ได้โดย

- เทสิ่งส่งตรวจลงไปใน Centrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm/นาที เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนบน (Supernatant) กลับคืน คงเหลือส่วนที่ตกตะกอนของ Centrifuge tube ประมาณ 1 – 2 มิลลิลิตร

- ใช้ Pipette ดูดของเหลวส่วนล่างของ Centrifuge tube แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นโดยใช้เครื่อง Cyto-spin ด้วยความเร็ว 800 rpm/นาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 แผ่น
- ใช้ Pipette ดูดของเหลวส่วนล่างของ Centrifuge tube แล้วนำของเหลวที่ได้มา Smear ลงบนไลด์ โดยใช้สไลด์ประกอบกันดึงสไลด์ออกจากกันในทิศทางตรงข้าม แล้วนำสไลด์มาแช่ทันทีใน 95% alcohol ปิดฝาให้สนิทแช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำมาย้อมสี ส่วนสไลด์อีก 1 แผ่น ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง (Air drying) โดยไม่ต้องแช่ 95% alcohol นำมาย้อม Wright stain [1]

<u>หลักในการย้อมสี Papanicolaou</u>

วิธีการย้อมแบบ Papanicolaou ซึ่งค้นคิดโดย Dr.Georage Papanicolaou นอกจากใช้ย้อมตัวอย่าง Pap smear แล้วยังนิยมใช้ย้อมสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยาเกือบทั้งหมด เช่น ตัวอย่างน้ำจากช่องต่างๆ ของร่างกาย การเจาะดูดก้อนตามร่างกายด้วยเข็มเล็ก เสมหะ ปัสสาวะ และน้ำจากไขสันหลัง เป็นต้น ตัวอย่างจะถูกป้ายหรือทำให้ติดลงบนแผ่นกระจกใส แล้วนำไปแช่ใน 95% ethyl alcohol เพื่อให้เซลล์ติดกับแผ่นสไลด์อย่างน้อย 15 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมสีด้วยวิธี Papanicolaou ซึ่งการย้อมด้วยวิธีทำให้สามารถดูรายละเอียดของนิวเคลียสได้ดี สามารถดูไซโตปลาสซึมของเซลล์ทำให้แยกชนิดของเซลล์ได้ ดูเคราตินที่เพิ่มขึ้น ดูเศษเซลล์ตายที่เกิดจากการอักเสบหรือจากการเป็นมะเร็ง ทำให้สามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง หลักในการตรวจสี Papnicolaou มี 2 ส่วนคือ การย้อมสีนิวเคลียสและการย้อมสีไซโตปลาสซึม

1. การย้อมสีนิวเคลียส โดยใช้สี Hematoxylin นิวเคลียสของเซลล์ติดสีน้ำเงิน เป็นการย้อมเพื่อแสดงลักษณะรายละเอียดของนิวเคลียส
2. การย้อมสีไซโตปลาสซึม ประกอบด้วยสี 2 ชนิดคือ Orange G6 และ EA 50 หรือ EA 65

   Orange G6 ติดสีชมพูหรือแดง คุณสมบัติของสีเป็นกรด จึงย้อมติดไซโตปลาสซึมของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง เซลล์ที่ย้อมติดสีชมพูแดง ได้แก่ Keratinizing squamous cells ที่มีปริมาณ Keratin มากในไซโตปลาสซึม และเซลล์ที่เสื่อมสภาพมีการติดสีชมพูแดงด้วยเช่นกัน เป็นสีที่มีโมเลกุลเล็กทำให้มีคุณสมบัติแทรกตัวเข้าสู่ไซโตปลาสซึมของเซลล์ได้ดี โดยเฉพาะเซลล์ที่มีโครงสร้างหนาแน่น

   EA 50 หรือ EA 65 มี 2 สี คือ สีเขียวอมฟ้า และสีชมพู ย้อมติดสีไซโตปลาสซึมของเซลล์ที่ไม่มีเคราติน เช่น Intermediate cells, Parabasal cells เซลล์เม็ดเลือดขาว ปรสิตจำพวก Trichomonas vaginalis สปอร์ของเชื้อรา เป็นต้น ประกอบด้วยสารเคมี 3 ชนิดคือ

   - Eosin Y ให้สีแดงหรือสีชมพู
   - Light green ให้สีเขียวอมฟ้า
   - Phosphotungstic acid เป็นตัวปรับค่าสมดุลของ pH ซึ่ง EA 65 มีภาวะเป็นกรดมากกว่า ส่งผลให้สีที่ย้อมไซโตปลาสซึมออกเป็นสีแดงมากกว่า EA50 การย้อมส่วนมากจึงนิยมใช้ EA50 มากกว่า ส่วน EA65 [1]

<u>ขั้นตอนการย้อมสี Papanicolaou</u>

นำสไลด์ Pap smear แช่ใน 95% ethyl alcohol อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้เซลล์ติดบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำมาเข้าสู่กระบวนการย้อมสี โดยจุ่มสไลด์ในน้ำกลั่นเพื่อให้เกิดการ Rehydration ย้อมสีนิวเคลียสด้วยสี Hematoxylin หลังจากนั้นการย้อมจะอยู่ในตัวทำละลายที่เป็น Ethyl alcohol จากนั้นย้อมสีไซโตปลาสซึมด้วย Orange G6 ต่อด้วย EA 50 สไลด์ที่ย้อมจะผ่านกระบวนการดูดน้ำออกเรียกว่า Dehydration โดยเพิ่มความเข้มข้น Alcohol ไปเรื่อยๆ จาก 95% ethyl alcohol ไปจนถึง Absolute ethyl alcohol เมื่อผ่านขั้นตอนนี้แล้วสไลด์ไม่ควรเหลือน้ำเจือปนซึ่งจะพร้อมเข้าสู่ขั้นตอน Clearing ต่อไป ขั้นตอน Clearing จะทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใสโดยแช่สไลด์ใน Xylene ก่อนนำไปปิดด้วยแผ่นกระจกบาง (Cover glass) โดยใช้น้ำยา Permount ซึ่งมีความเหนียวทำให้แผ่นกระจกบางติดกับสไลด์ได้ เรียงลำดับขั้นตอนการย้อมสีได้ดังนี้

1. นำสไลด์ที่ผ่านการ Fix ด้วย 95% alcohol ใส่ใน Rack แล้วจุ่มขึ้นลงในน้ำกลั่น 10 จุ่ม
2. แช่ลงในสี Harris's hematoxylin 3 นาที
3. แช่ลงในโถที่มีน้ำประปาไหลผ่านจนกระทั่งสีจาง
4. จุ่มขึ้น – ลง ใน 0.5% HCl 1 จุ่ม
5. ล้างโดยแช่ในโถที่มีน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที
6. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
7. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
8. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
9. จุ่มขึ้น – ลงในสี OG6 20 จุ่ม
10. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
11. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
12. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
13. แช่ลงในสี EA50 3 นาที
14. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
15. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
16. จุ่มขึ้น – ลงใน 95% ethyl alcohol 10 จุ่ม
17. จุ่มขึ้น – ลงใน Isopropyl alcohol 10 จุ่ม
18. จุ่มขึ้น – ลงใน Isopropyl alcohol 10 จุ่ม
19. จุ่มขึ้น – ลงใน Xylene 10 จุ่ม
20. จุ่มขึ้น – ลงใน Xylene 10 จุ่ม
21. จุ่มขึ้น – ลงใน Xylene 10 จุ่ม
22. จุ่มขึ้น – ลงใน Xylene 10 จุ่ม
23. ใช้ปากคีบ (Forcep) คีบสไลด์จากโถ่แช่ Xylene
24. เช็ดด้านหลังและด้านข้างของสไลด์ด้วยกระดาษเช็ดสไลด์
25. หยด Permount 1 หยด ลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วย Cover glass ขนาด 24x50 มิลลิเมตร หรือ 24x60 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับความยาวของปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ป้ายบนสไลด์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

ในการควบคุมคุณภาพสีย้อมประจำ สามารถเพิ่มหรือลดเวลาในการย้อมสีได้ โดยปรับตามความเข้มของสีสไลด์ซึ่งดึงมาจากสไลด์ชุดแรกที่ทำการย้อมสีในแต่ละวัน [2]

<u>เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)</u>

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับเร่งการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลายๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกันออกจากกัน โดยอาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge force) ที่เกิดจากการหมุนรอบจุดหมุน (Center of rotation) เครื่องปั่นเหวี่ยงจะมีแกนหมุนเป็นมอเตอร์ไฟฟ้า เมื่อมีกระแสไฟฟ้าเข้ามาที่มอเตอร์จะเหนี่ยวนำให้เกิดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้แกนมอเตอร์หมุน ความเร็วรอบในการหมุน (rpm = round per minutes) ควบคุมด้วยวงจรไฟฟ้า [3]

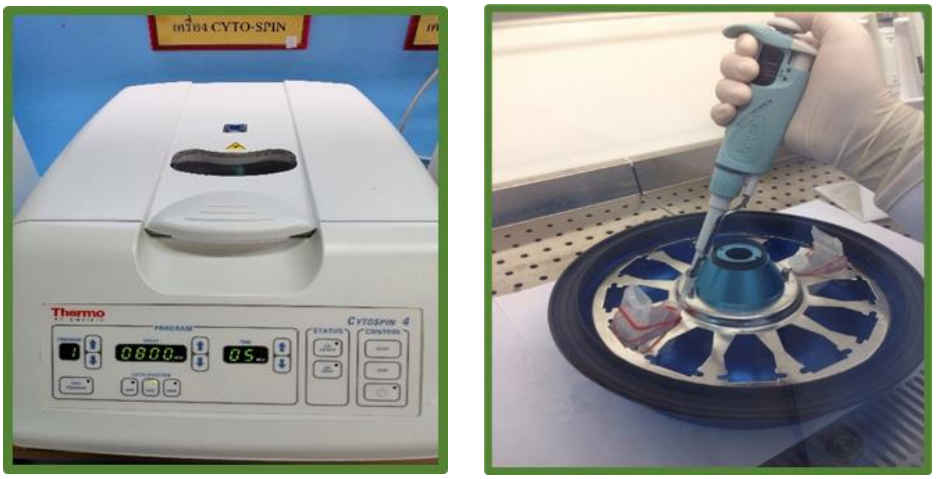
<u>รูปที่ 1</u> เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)

วิธีการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

1. นำของเหลวที่ต้องการปั่นใส่ลงใน Centrifuge tube ขนาด 8x15 ml โดยแบ่งเป็น 2 หลอดให้มีปริมาตรเท่า ๆ กัน ถ้าของเหลวมีจำนวนน้อยให้ใช้หลอดเพียงหลอดเดียวก็ได้ แต่ให้นำหลอดเปล่ามาเติมน้ำให้ปริมาตรเท่ากับหลอดตัวอย่าง ถ้าของเหลวนั้นมีปริมาตรมากอาจแบ่งได้หลายหลอด แต่จำนวนหลอดที่ใช้ต้องเป็นจำนวนคู่
2. เสียบปลั๊กไฟ แล้วกดปุ่มเปิด-ปิด [I] ซึ่งอยู่บริเวณด้านหลังเครื่อง หน้าจอเครื่องมีไฟติด
3. กดปุ่ม OPEN ฝาครอบช่องหัวปั่นจะเปิดออก นำหลอดที่ใส่ของเหลว ใส่ลงในช่องใส่หลอดของหัวปั่นของเครื่อง Centrifuge โดยจัดวางให้หลอดที่มีปริมาตรเท่ากันอยู่ในช่องตรงข้ามกัน เพื่อความสมดุลขณะปั่น แล้วปิดฝาครอบช่องหัวปั่น
4. หมุนปุ่มตั้งเวลาเพื่อตั้งเวลาตามต้องการเป็นเวลา 5 นาที
5. หมุนปุ่มปรับจำนวนรอบขึ้นทีละน้อยจนได้จำนวนรอบการหมุน 3000 รอบต่อนาที
6. เมื่อครบเวลาที่ตั้งไว้ เครื่องจะค่อย ๆ ลดความเร็วรอบลง จนหัวปั่นหยุดสนิท เครื่องมีเสียงเตือนและฝาครอบช่องหัวปั่นจะเปิดออก นำหลอดออกจากเครื่อง ระวังอย่าให้หลอดกระเทือนเพราะตะกอนจะฟุ้งขึ้นมา
7. ปิดฝาครอบช่องหัวปั่น
8. กดปุ่มเปิด-ปิด [I] ซึ่งอยู่บริเวณด้านหลังเครื่อง หน้าจอเครื่องไฟดับ
9. ถอดปลั๊กไฟ

<u>เครื่องปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์อัตโนมัติ (Cyto-spin)</u>

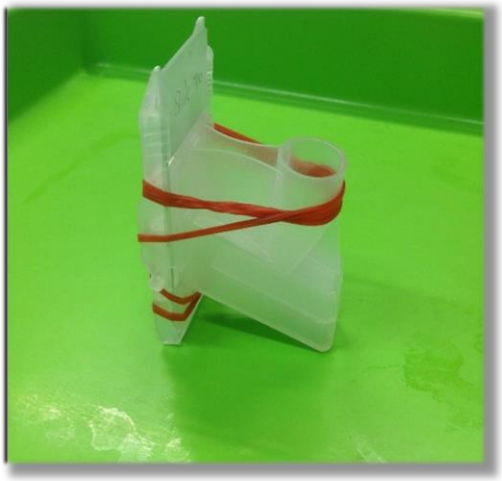
เครื่องปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์โดยอัตโนมัติ (Cyto-spin) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยาที่เป็นของเหลว เพื่อทำการแยกและปั่นเซลล์ให้ติดลงบนแผ่นสไลด์ ใช้สำหรับสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณเซลล์น้อยและใส เซลล์ที่ได้จะตกตะกอนลงบนแผ่นสไลด์ในพื้นที่สี่เหลี่ยม [4]



<u>รูปที่ 2</u> เครื่องปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์อัตโนมัติ (Cyto-spin)

วิธีการใช้เครื่อง Cyto-spin

1. เสียบปลั๊กไฟ แล้วกดปุ่มเปิด [I] ซึ่งอยู่บริเวณฐานเครื่องด้านหลังเครื่อง
2. กดปุ่ม open เปิดฝาเครื่องด้านบน
3. ดึงถาดใส่สิ่งส่งตรวจขึ้น โดยจับปุ่มสีดำตรงกลางถาด ใช้มือประคองใต้ถาดเพื่อกันหล่นกระแทก
4. ดึงปุ่มสเตนเลสตรงกลางถาดพร้อมเปิดฝา
5. ใส่กรวยบรรจุสิ่งส่งตรวจ (Chamber megafunnel) ลงไปในถาดพร้อมหัวปั่น (Sealed head) ให้สมดุลกัน
6. ปิดฝาและกดปุ่มสเตนเลสตรงกลางถาดพร้อมหัวปั่นเพื่อล็อคฝา
7. นำถาดพร้อมหัวปั่นกลับเข้าเครื่อง
8. ปิดฝาเครื่อง
9. กดปุ่ม Set time กดปุ่มตัวเลขเพื่อตั้งเวลา (นาที) กดปุ่ม Enter
10. กดปุ่ม Set speed กดปุ่มตัวเลขเพื่อตั้งความเร็วรอบ (RPM) กดปุ่ม Enter
11. กรณีกดไม่ถูกต้องหรือต้องการเปลี่ยนแปลงเวลา และความเร็วรอบเปลี่ยนแปลงได้โดยกดปุ่ม Cancel แล้ว กดปุ่มตั้งเวลาใหม่
12. กดปุ่ม Start เครื่องเริ่มทำงาน
13. เครื่องทำงานเสร็จมีเสียงเตือน กดปุ่ม Open lid เปิดฝาเครื่องนำถาดพร้อมหัวปั่นออกจากเครื่อง เมื่อเลิกใช้งานแล้ว กดปุ่มปิด [O] (ปุ่มเดียวกับปุ่มเปิด) ถอดปลั๊กไฟ



<u>รูปที่ 3</u> อุปกรณ์ประกอบ (Chamber megafunnel) สำหรับใช้กับเครื่อง Cyto-spin Chamber megafunnel ใหม่ (ซ้ายมือ) Chamber megafunnel ใช้ซ้ำ (ขวามือ)

<u>บทที่3</u>
ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เตรียม Fluid specimen โดยใช้

จัดหา Fluid specimen สำหรับทำการทดลอง นำมาเตรียมโดยใช้เครื่อง Cyto-spin ใช้ Chamber megafunnel จำนวน 3 อัน (A, B, C)

1.1) เท Fluid specimen ลงในหลอดทดลองจำนวน 150 หลอด หลอดละ 3 ml

1.2) นำหลอดทดลองใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

1.3) เทส่วนบน Supernatant ทิ้ง นำส่วนที่ตกตะกอนมาใช้ในการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Cyto-spin 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที

1.4) สไลด์ที่ได้แช่ใน 95% ethyl alcohol เป็นเวลา 30 นาที

1.5) ย้อมสไลด์ด้วยวิธี Papanicolaou stain

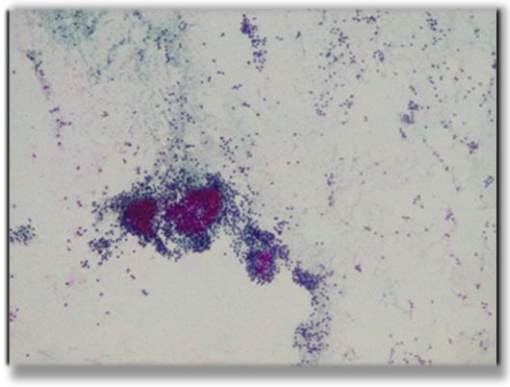
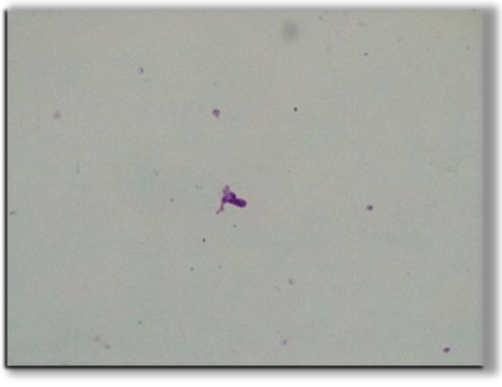
1.6) ล้าง Chamber megafunnel A, B และ C ทำให้แห้งโดยใช้ไดรท์เป่า

1.7) นำ Chamber megafunnel A, B และ C มาเตรียม Fluid specimen โดยทำตามขั้นตอนที่ 1.1 – 1.6 โดยใช้ Chamber megafunnel ซ้ำ Chamber ละ 50 ครั้ง

2. ประเมินคุณภาพสไลด์

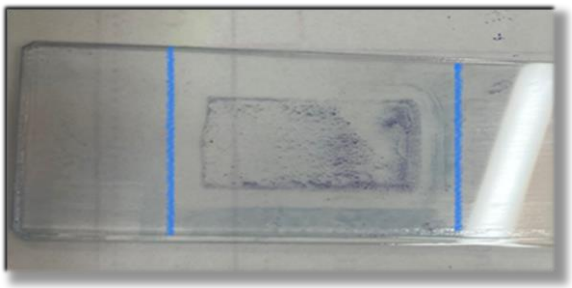
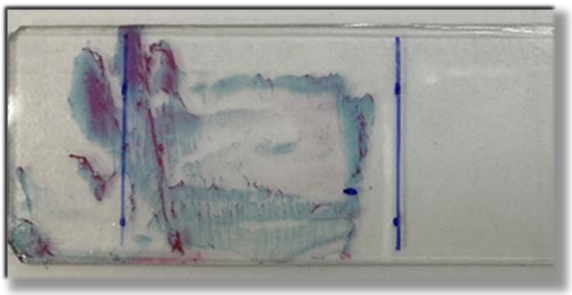
นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้เกณฑ์ผ่านและไม่ผ่าน โดยดูปริมาณเซลล์ (Cellularity) การเรียงตัวอยู่ในกรอบและการ Well - preserved ของเซลล์ เทียบเท่ากับการเปิดใช้ Chamber megafunnel ที่เปิดใช้ในครั้งแรก (รูปที่ 4-6)

1) ปริมาณเซลล์ (Cellularity)

	
ผ่าน	**ไม่ผ่าน**

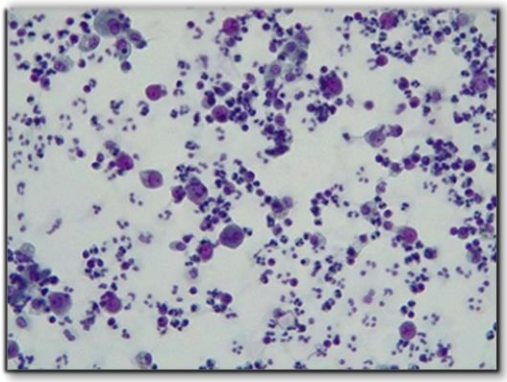
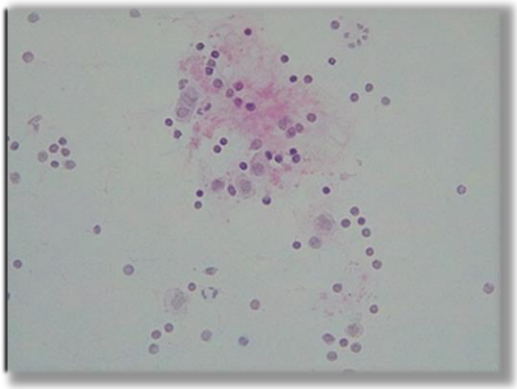
<u>รูปที่4</u> แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (Cellularity) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) การเรียงตัวอยู่ในกรอบ

	
ผ่าน	**ไม่ผ่าน**

<u>รูปที่5</u> แสดงผลการเปรียบเทียบการเรียงตัวอยู่ในกรอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3) การ Well - preserved ของเซลล์

	
ผ่าน	**ไม่ผ่าน**

<u>รูปที่6</u> แสดงผลการ Well - preserved ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. สรุปผลการดำเนินงานและเปรียบเทียบค่าใช้จ่าย

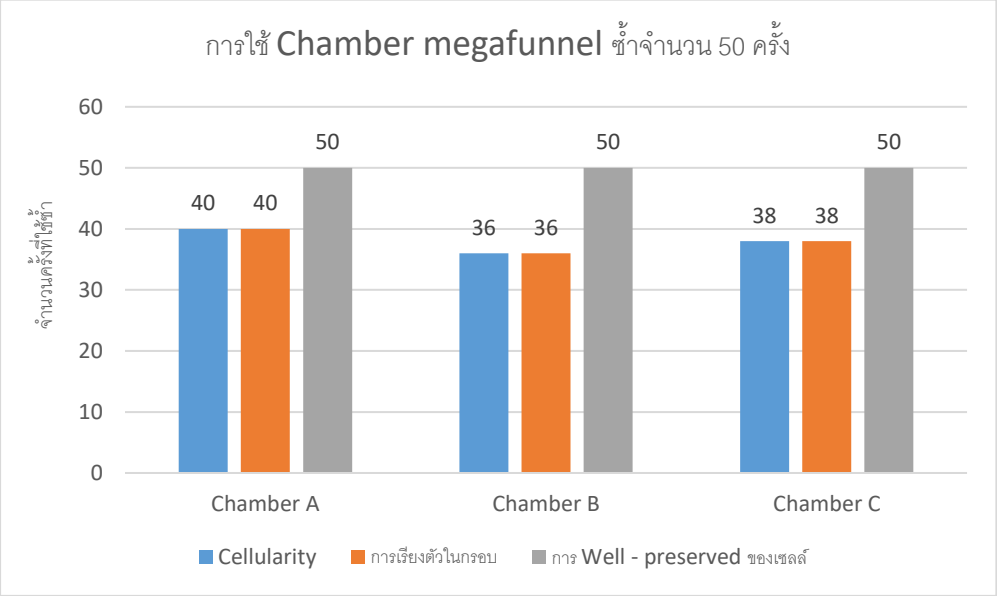
บทที่ 4

ผลการดำเนินการ

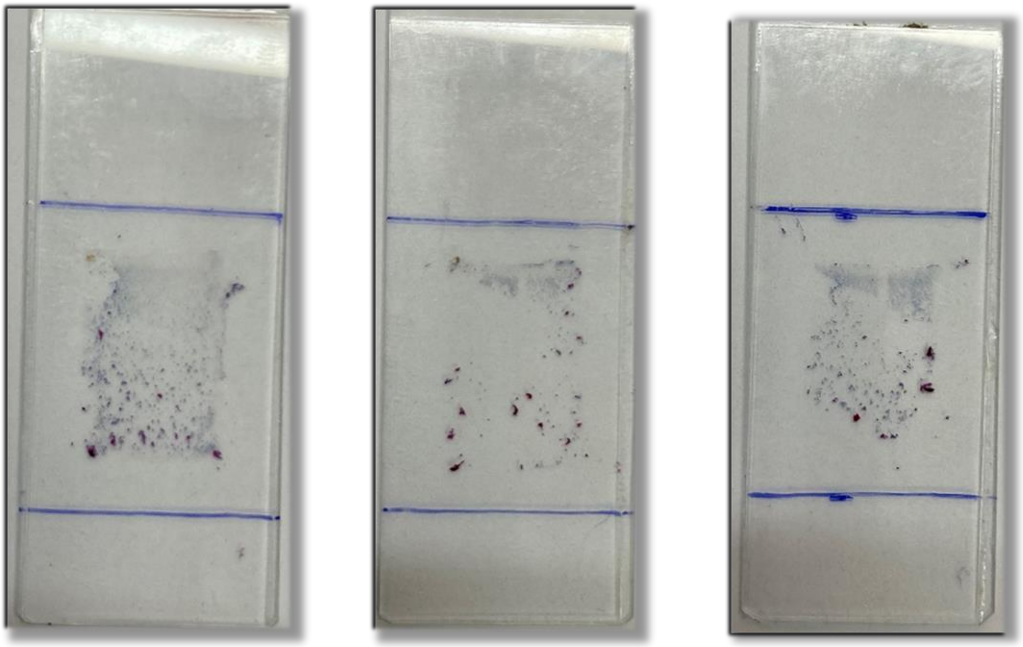
1. นำสไลด์ที่ได้จากการย้อมสีแล้วมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูปริมาณเซลล์ (Cellularity) การเรียงตัวอยู่ในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์ ของ Chamber megafunnel A, B และ C จากการนำมาใช้ซ้ำ 50 ครั้ง

ลักษณะที่ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์	Chamber megafunnel A	Chamber megafunnel B	Chamber megafunnel C	เฉลี่ย (ครั้ง)
1.ปริมาณเซลล์ (Cellularity) ผ่านเกณฑ์	40 ครั้ง	36 ครั้ง	38 ครั้ง	38
2.การเรียงตัวในกรอบ ผ่านเกณฑ์	40 ครั้ง	36 ครั้ง	38 ครั้ง	38
3.การ Well - preserved ของเซลล์ ผ่านเกณฑ์	50 ครั้ง	50 ครั้ง	50 ครั้ง	50

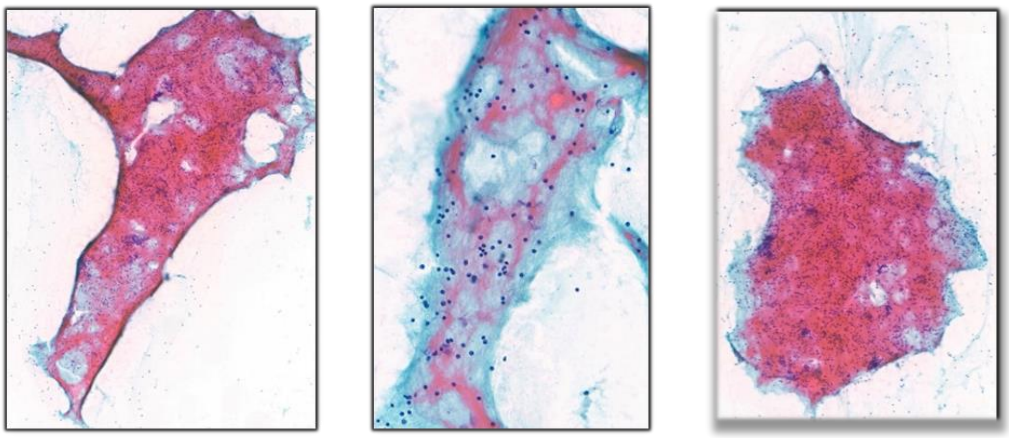
จากการทดลอง การใช้ Chamber megafunnel ทั้ง 3 ชิ้น ซ้ำจำนวน 50 ครั้ง แล้วนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูตามเกณฑ์ที่ได้กำหนดไว้ว่าลักษณะของปริมาณเซลล์และการเรียงตัวอยู่ในกรอบ จะเป็นเช่นเดียวกับ Chamber megafunnel ที่มีการเปิดใช้ในครั้งแรก พบว่า Chamber megafunel A มีปริมาณเซลล์และการเรียงตัวอยู่ในกรอบผ่านทั้งหมด 42 ครั้ง Chamber megafunnel B ผ่านทั้งหมด 36 ครั้ง และ Chamber megafunnel C ผ่านทั้งหมด 38 ครั้ง เมื่อนำมาค่าหาเฉลี่ยทั้ง 3 ชิ้น แล้วพบว่า Chamber megafunnel 1 ชิ้น จะสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 38 ครั้ง ส่วนการ Well - preserved ของเซลล์ จาก Chamber megafunnel ทั้ง 3 ชิ้น ผ่านทั้งหมดจากการใช้ซ้ำ 50 ครั้ง



ตารางแผนภูมิที่1 แสดง ปริมาณเซลล์ การเรียงตัวในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์ จากการใช้ Chamber megafunnel ทั้ง 3 ชิ้น จำนวน 50 ครั้ง



<u>รูปภาพที่ 7</u> แสดงลักษณะ ปริมาณเซลล์ (Cellularity) และการเรียงตัวอยู่ในกรอบในพื้นที่ Cyto-spin โดย Chamber megafunnel A จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 40 (ซ้ายมือ) Chamber megafunnel B จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 36 (ตรงกลาง) และ Chamber megafunnel C จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 38 (ขวามือ)



<u>รูปภาพที่ 8</u> แสดงลักษณะ การ Well - preserved ของเซลล์ โดย Chamber megafunnel A จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 40 (ซ้ายมือ) Chamber megafunnel B จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 36 (ตรงกลาง) และ Chamber megafunnel C จากการใช้ซ้ำครั้งที่ 38 (ขวามือ)

2. สรุปผลการดำเนินงานและเปรียบเทียบค่าใช้จ่าย

Chamber megafunnel A, B และ C เมื่อนำมาใช้ซ้ำ โดยที่ปริมาณเซลล์ (Cellularity) การเรียงตัวอยู่ในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์ มีคุณภาพใกล้เคียงกับ Chamber megafunnel ที่เปิดใช้ในครั้งแรก สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 38 ครั้ง เมื่อนำมาคำนวณค่าใช้จ่ายในการเตรียมสิ่งส่งตรวจ พบว่า

- Chamber megafunnel 1 กล่อง มี 25 ชิ้น ราคากล่องละ 4,500 บาท
- Chamber megafunnel 1 ชิ้น ราคาเท่ากับ 180 บาท
- Chamber megafunnel 1 ชิ้น ใช้ได้ 38 ครั้ง ราคาเท่ากับ 6,840 บาท
  สามารถลดค่าใช้จ่ายได้ 6,600 บาท

ในการเตรียมสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี Cyto-spin จะใช้ Chamber megafunnel 2 ชิ้น/ 1 ราย ดังนั้น หากเราเตรียมสิ่งส่งตรวจจำนวน 38 ราย จะใช้ค่าใช้จ่ายทั้งหมด 13,680 บาท จากกการทดลองสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ 13,320 บาท

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยาที่เป็นน้ำเจาะจากส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Fluid specimen) เช่น น้ำจากไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid) น้ำปัสสาวะ (Urine) น้ำจากช่องท้อง (Peritoneal effusion/ Ascites) น้ำจากช่องปอด (Pleural effusion) เป็นต้น สิ่งส่งตรวจเหล่านี้ทั้งที่มีปริมาณน้อยหรือมาก แต่มีลักษณะใส กลุ่มงานเซลล์วิทยา สถาบันพยาธิวิทยา จะใช้วิธี Cyto-spin มาช่วยในการเตรียมสิ่งส่งตรวจ เพราะวิธีนี้จะเป็นการปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนลงบนสไลด์โดยอัตโนมัติ ทำให้เราได้เซลล์ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นและเพียงพอต่อการวินิจฉัยโรค อุปกรณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งของวิธีนี้คือ Chamber megafunnel ซึ่งมีไว้สำหรับใส่ Fluid specimen และสไลด์ Chamber megafunnel นี้มีราคาค่อนข้างสูง ผลิตมาให้ใช้ 1 ชิ้น/ ครั้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาจำนวนการใช้ซ้ำของ Chamber megafunnel จะมีคุณภาพใกล้เคียงกับ Chamber megafunnel ที่เปิดใช้ในครั้งแรก โดยดูจากปริมาณเซลล์ การเรียงตัวอยู่ในกรอบ และการ Well - preserved ของเซลล์ จากการทดลอง Chamber megafunnel ทั้ง 3 ชิ้น พบว่า สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 38 ครั้ง Chamber megafunnel ราคาชิ้นละ 180 บาท สามารถเตรียม Fluid specimen ได้ 38 ครั้ง ลดต้นทุนได้ 6,660 บาท แต่เนื่องจากการเตรียม Fluid specimen 1 รายจะใช้ Chamber megafunnel 2 ชิ้น เมื่อนำมาเตรียมทั้งหมด 38 รายจะคิดเป็นเงิน 13,680 บาท จากการทดลองนี้ใช้เพียง 360 บาท จึงสามารถลดต้นทุนในการเตรียมสิ่งส่งตรวจได้ 13,320 บาท

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. Chamber megafunnel จากการทำซ้ำมากกว่า 40 ครั้ง พบว่ายังสามารถใช้งานต่อไปได้ แต่ปริมาณเซลล์ในพื้นที่ Cyto-spin เริ่มลดลง เนื่องจากมีการกระจายตัวออกนอกกรอบมากขึ้น ทำให้การเรียงตัวอยู่ในกรอบลดน้อยลง
2. การใช้ยางรัดของรัด Chamber megafunnel ควรมีการรัดอย่างน้อย 2 เส้น เนื่องจากยางรัดของอาจขาดได้ในขณะที่ทำการปั่น Cyto-spin สไลด์จะไม่แนบกับ Chamber megafunnel ทำให้เกิดการกระจายออกนอกกรอบพื้นที่ Cyto-spin ได้
3. Chamber megafunnel ที่เปิดใช้ครั้งแรก อาจมีการกระจายหลุดออกนอกกรอบได้บ้าง เนื่องจากลักษณะสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดมีความเหลวและความหนืดไม่เหมือนกัน
4. สไลด์ปลายฝ้ามีการเคลือบด้วยไข่ขาว (Egg albumin) หากเคลือบหนาเกินไป เมื่อนำมาย้อมจะติดสีฟ้าบนพื้นหลัง

บรรณานุกรม

1. แนวทางการปฏิบัติสำหรับงานเซลล์วิทยา (PARCTICAL GUIDELINE FOR CYTOLOGY) จัดทำโดย ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย ร่วมกับสมาคมเซลล์วิทยาแห่งประเทศไทย (พิมพ์ครั้งแรก : มิถุนายน 2550)
2. วิธีปฏิบัติงาน เลขที่ IOP-WP-CY-02 เรื่อง การรับ เตรียม และรายงานผลสิ่งส่งตรวจเซลล์วิทยาระบบ Non-gyn และ FNA และเกณฑ์การปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ จัดทำโดยกลุ่มงานเซลล์วิทยา สถาบันพยาธิวิทยา 2561
3. วิธีการใช้เครื่องมือ เลขที่ IOP-MN-CY-03 เรื่อง เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) จัดทำโดย กลุ่มงานเซลล์วิทยา สถาบันพยาธิวิทยา 2564
4. วิธีการใช้เครื่องมือ เลขที่ IOP-MN-CY-02 เรื่อง เครื่องปั่นตกตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์โดยอัตโนมัติ (Cyto-spin) จัดทำโดยกลุ่มงานเซลล์วิทยา สถาบันพยาธิวิทยา 2564